



TITLE:

# Simple Derivation of Spinal Motor Neurons from ESCs/iPSCs Using Sendai Virus Vectors( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Goto, Kazuya

---

CITATION:

Goto, Kazuya. Simple Derivation of Spinal Motor Neurons from ESCs/iPSCs Using Sendai Virus Vectors. 京都大学, 2017, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2017-07-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20609>

RIGHT:

Kazuya Goto, Keiko Imamura, Kenichi Komatsu, Kohnosuke Mitani, Kazuhiro Aiba, Norio Nakatsuji, Makoto Inoue, Akihiro Kawata, Hirofumi Yamashita, Ryosuke Takahashi, Haruhisa Inoue, Simple Derivation of Spinal Motor Neurons from ESCs/iPSCs Using Sendai Virus Vectors, Molecular Therapy - Methods & Clinical Development, Volume 4, 2017, Pages 115-125, ISSN 2329-0501, <http://dx.doi.org/10.1016/j.omtm.2016.12.007>(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2329050117300013>)

京都大学	博士（医学）	氏 名	後 藤 和 也
論文題目	Simple Derivation of Spinal Motor Neurons from ESCs/iPSCs Using Sendai Virus Vectors (センダイウイルスベクターを用いた ES 細胞/iPS 細胞から脊髄運動神経細胞への簡便な作製)		
(論文内容の要旨)			
<p>【背景】筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis: ALS）は進行性の筋力低下と筋萎縮をきたす神経難病で、発症後、数年以内で死に至る。これまで多くのモデル動物が作製されたが、病因は未解明の部分が多く、患者由来の疾患モデルの作製が望まれている。2007 年に報告されたヒト人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells: iPS 細胞）を用いて患者由来の疾患モデル作製が可能になったが、細胞分化方法には課題が多い。</p> <p>【目的】これまでの分化方法は化合物により発生過程を再現するものが多い。2011 年にヒト iPS 細胞から神経前駆細胞へ分化誘導後、アデノウイルスベクターを用いて 3 つの転写因子 LIM/homeobox protein 3 (Lhx3), Neurogenin 2 (Ngn2), Islet-1 (Isl1)を導入することで脊髄運動神経細胞を作製する方法が報告された。しかし、これらの方法は多段階の手順を踏む必要がある。そこでより簡便な方法でヒト iPS 細胞から脊髄運動神経細胞へ分化する方法を確立することにした。</p> <p>【方法・結果・考察】分化方法を簡便にするため、上記の Lhx3, Ngn2, Isl1 を iPS 細胞へ導入して脊髄運動神経細胞への分化を試みた。転写因子の導入に関して、宿主細胞へ遺伝子が挿入されないセンダイウイルス（SeV）ベクターを用いた。まず、各転写因子を別々の SeV ベクターに搭載し、iPS 細胞に導入したところ、第 14 日目で神経細胞マーカーと脊髄運動神経細胞マーカーの発現を認めた。続いて 3 つの転写因子の全組み合わせを試したところ、Lhx3、Ngn2 を導入した際にも脊髄運動神経細胞マーカーが陽性となった。このことは、別々のベクターに搭載して導入した場合、3 つの転写因子で作製した脊髄運動神経細胞と 2 つの転写因子で作製した脊髄運動神経細胞が混在することを示していた。そこで、3 つの転写因子全てを 1 つの SeV ベクターに搭載し、iPS 細胞へ導入したところ、第 14 日目に神経細胞マーカーと脊髄運動神経細胞マーカーの発現が確認できた。また、神経筋接合部の形成を免疫染色で確認し、電気生理学的検査で活動電位を確認した。しかし、全細胞に対する割合は約 5%であった。この理由の 1 つとして SeV ベクターが導入されなかった細胞が増殖した可能性を考えた。そこで、3 つの転写因子と EGFP を搭載した SeV ベクターを作製し、iPS 細胞へ導入した。その結果、EGFP 陽性の細胞のうち、90%以上で神経細胞マーカー、脊髄運動神経細胞マーカーが陽性であった。また、脊髄の各レベルで発現が異なる Homeobox (HOX) 遺伝子を調べたところ、60%以上が頸髄～胸髄レベルの脊髄運動神経細胞であった。さらに、この分化方法で家族性 ALS 患者由来の iPS 細胞を脊髄運動神経細胞に分化したところ、superoxide dismutase 1 (SOD1)変異を持つ患者由来の神経細胞で misfolded SOD1 を有する細胞の増加を認め、同様に TAR DNA-binding protein (TDP-43)変異を持つ患者由来の神経細胞では、細胞質に TDP-43 の凝集を有する細胞の増加を認め</p>			

<p>た。これらの結果より、この分化方法は ALS 細胞モデルの作製にも有用であることが確認された。</p> <p>【結論】本研究で開発した細胞分化方法は、iPS 細胞からの脊髄運動神経細胞作製をより簡便にし、運動神経疾患の疾患解析にも有用と考えられる。</p>			
<p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>筋萎縮性側索硬化症（ALS）は進行性の筋力低下と筋萎縮をきたす神経難病で、病因は未解明の部分が多い。モデル動物に代わる病態解析の手段として、ヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を用いた患者由来の疾患モデル作製が可能であるが、これまでの分化方法はステップが多く、脊髄運動神経細胞を作製できないことも経験する。</p> <p>本研究ではセンダイウイルス(SeV)ベクターに LIM/homeobox protein 3 (Lhx3), Neurogenin 2 (Ngn2), Islet-1 (Isl1)の 3 つの転写因子を搭載し、iPS 細胞へ導入することで脊髄運動神経細胞を作製できる簡便な方法を確立した。この方法を用い、14 日目に脊髄運動神経細胞マーカーが発現することを免疫染色と定量的 PCR 法により確認した。また、SeV ベクターを導入した細胞の 90%以上が脊髄運動神経細胞へ分化し、そのうち 60%以上が頸髄～胸髄レベルの運動神経細胞特異的マーカーを発現していた。神経筋接合部の形成や、電気生理学的興奮も認めた。さらに、導入後 2 日目には脊髄運動神経細胞マーカーである HB9 が発現した。</p> <p>この分化方法で家族性 ALS 患者由来の iPS 細胞を脊髄運動神経細胞に分化したところ、病理所見を再現する異常タンパクの蓄積を有する細胞の増加を認め、ALS 細胞モデルの作製にも有用であることが示された。</p>			
<p>以上の研究は iPS 細胞からの脊髄運動神経細胞分化の簡便化・効率化に貢献し、ALS の疾患解析に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 2 9 年 4 月 2 8 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
要旨公開可能日：                      年                      月                      日 以降			